

〈Review paper〉

Azole계열 항곰팡이 물질의 양서류 독성: 총설

박찬진 · 박용아 · 옥승석 · 계명찬*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Effects of Azole Fungicide on Amphibian: Review

Chan Jin Park, Yong Ah Park, Seung Seok Ok and Myung Chan Gye*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Abstract - Amphibians play a pivotal role in the ecosystem as a mediator between aquatic and terrestrial environment. Currently they are directly exposed to a variety of chemicals in the aquatic environment throughout their life cycle. Azole fungicides have been widely used in medical applications and agricultural activities. The direct exposure of azole fungicides causes an alarming situation for various ecosystem. Recently, teratogenesis and endocrine disruption by azole fungicides have been reported in amphibians. In an effort to provide the current information for amphibian toxicity of azole fungicides and to make the guidelines for safe usage of azole-based materials, the effects of azole fungicides including imidazole, triazole, thiazole, oxazole, and pyrazoleon on early development, differentiation and reproduction of amphibians were reviewed.

Key words : azole, fungicide, amphibian, toxicity

서 론

양서류는 초기 발생단계 (early developmental stage)와 유생시기 (tadpole stage)를 수중에서 보낸 후 변태 과정을 거쳐 몇 종을 제외한 대부분의 종이 육상 생활을 하는 척추동물이다. 이러한 생활사적 특징으로서 양서류는 진화적, 생태학적으로 육상과 수상 생태계를 잇는 매개체 역할을 하며, 수생태계의 건강도를 대변하는 지표로서 유용하다. 양서류의 배아 (embryo)와 유생은 모체와 독립되어 수환경 내에서 초기발생 및 성장하기 때문에 수환경에 존재하는 다양한 화학물질에 직접적으로 노출될 수 있다. 또한 양서류는 먹이사슬의 중간 소비자로서

수환경 내의 오염물질의 생물농축 효과가 나타날 수 있다. 이러한 특성으로 인해 양서류 배아 또는 유생을 이용한 독성평가가 비교적 용이하여 이를 활용한 독성평가가 활발하게 이뤄지고 있다 (Boyer and Grue 1955; Lahr 1997; Bogi *et al.* 2003; Kloas and Ltuz 2006; Loeffler *et al.* 2011).

항곰팡이제는 농업 (fungicide)과 의약품 (antifungal agent)으로 널리 사용되는 화학물질이다. 곰팡이에 대한 작용기작 및 화학구조에 따라 곰팡이의 sterol에 작용하는 polyene계열, allylanine계열, azole계열, 세포벽에 작용하는 glucan 합성저해 물질, 핵에 작용하는 5-fluorocytosine으로 분류할 수 있다 (Ghannoum and Rice 1999). 이 중 azole계열의 항곰팡이제는 imidazole, triazole, thiazole 등으로 구분되며, 다양한 형태로 제품화되어 항곰팡이제 및 의약품으로 널리 사용되고 있다 (Zarn *et al.* 2003). Azole계열 항곰팡이제는 세포막에서 ergosterol의 합성

* Corresponding author: Myung Chan Gye, Tel. 02-2220-0958, Fax. 02-2298-9646, E-mail. mcgye@hanyang.ac.kr

을 억제한다. 곰팡이의 세포막에서 lanosterol을 ergosterol로 변환시키는 fungal cytochrome P450 효소의 작용을 억제하여 ergosterol이 고갈되고 14 α -methylated sterol이 축적되게 한다. 이에 따라 세포막에서의 영양 수송 및 키틴의 합성이 방해되어 곰팡이의 성장이 저하된다. Ergosterol은 곰팡이에서 호르몬과 유사한 기능을 하여 성장 및 증식을 자극하는데 azole계열 항곰팡이제는 이러한 기능들을 억제한다(Shееhan *et al.* 1999). Azole계열의 물질들은 공통적으로 5각형의 azole 고리를 가지고 있으며 고리 내 N의 개수에 따라 3개일 경우 triazole, 2개일 경우 imidazole과 pyrazole (azole 고리 내에 nitrogen이 직접적으로 결합하고 있는 경우)로 분류되며, 고리 내에 sulfur를 포함하고 있을 경우 thiazole로 분류된다. 또한, azole 고리 내에 oxygen을 갖는 경우 oxazole로 구분된다. Imidazole계열 화합물로는 대표적으로 clotrimazole, ketoconazole, miconazole 등이 있으며, triazole은 fluconazole, itraconazole, triadimefon 등이 대표적이다. 또한, thiabendazole, vinclozolin, pyraclostrobin 등은 각각 thiazole, oxazole, pyrazole에 속한다(Hewitt 1998; Safrin 2009). 이들 azole계 항곰팡이제들은 일반적으로 체외에서 어류와 인간조직에서 테스토스테론(testosterone)이 에스트라디올(estradiol; E₂)로 변환시키는 아로마타제(cytochrome P450 aromatase; CYP19)의 작용을 방해하는 것으로 잘 알려져 있다(Trösken *et al.* 2004). 또한, vinclozolin 및 그 대사체들은 항남성호르몬 특성을 갖는 것이 잘 알려져 있다(Kelce and Wilson 1997).

Azole은 농약으로써 사용되는 경우 경작지 주변의 개천 등으로 흘러 들어가기 쉬우며, 의약품으로 사용된 경우 하수를 통해 하천으로 유입되어 수생 생물 및 육수 환경 전반에 영향을 줄 수 있다(Zarn *et al.* 2003; Ankley *et al.* 2005). 현재까지 하수 및 하천수에서 azole 검출사례는 많지 않지만, 영국의 사례로 하천수에서 clotrimazole이 34 ng L⁻¹ (0.099 nM) 이상의 농도로 검출되었으며, 하수처리장 배출수에서 10~27 ng L⁻¹ (0.029~0.078 nM)가 검출되었다(Thomas *et al.* 2004; Roberts *et al.* 2006). 스위스의 10개소의 하수처리장 유입수 및 배출수에서 azole계 화합물의 농도를 조사한 결과 유입수 및 배출수에서 fluconazole은 32~109 ng L⁻¹ (0.104~0.356 nM), 28~83 ng L⁻¹ (0.091~0.271 nM), clotrimazole은 12~78 ng L⁻¹ (0.035~0.226 nM), 5 ng L⁻¹ (0.014 nM) 이하, propiconazole은 4~27 ng L⁻¹ (0.012~0.079 nM), 5~40 ng L⁻¹ (0.015~0.117 nM), tebuconazole은 8 ng L⁻¹ (0.026 nM) 이하, 1~10 ng L⁻¹ (0.003~0.032 nM)로 검출되었다(Kahle *et al.* 2008). 이러한 결과는 하수처리과정동안 clotrimazole을 제외한

fluconazole, propiconazole, tebuconazole의 분해 효율이 매우 낮음을 보여준다. 미국에서는 2000년대에 콩을 비롯한 농작물에 살포되는 항곰팡이제의 종류 및 사용량이 급증함에 따라 항곰팡이제의 수계 유출 현황을 분석하였다. 미국의 수계에서 2005년부터 2006년까지 13개 주, 29개 하천, 103개의 샘플에서 항곰팡이제를 검출한 결과, cyproconazole과 metconazole은 검출되지 않았지만 propiconazole은 4개 지점에서 18회 검출되었으며, 최대 1.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.003 μM) 농도로 확인되었다. 또한, tebuconazole과 tetraconazole 역시 각각 3개, 1개 지점에서 6회, 1회 검출되었으며, 검출된 최대농도는 tebuconazole은 0.115 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.374 nM), tetraconazole은 0.047 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.126 nM)였다. 또한 항곰팡이제는 작물들의 주요 성장기인 7월~9월에 최대치로 검출되었다(Battaglin *et al.* 2011). 이 연구에서 주목할 만한 점은 미국의 농지 주변 수계에서 검출된 propiconazole과 tebuconazole의 농도가 스위스의 하수처리장 유입수에서보다 높다는 사실이다. 농작물에 살포되는 항곰팡이제는 농작물을 섭취하는 인간에게 흡수될 수 있다. 다양한 농작물들 중 포도는 항곰팡이제가 가장 많이 살포되는 작물 중 하나이다(Giannessi and Reigner 2006). 이와 관련하여 103가지 와인에 포함된 13가지 azole을 분석한 연구에서 epoxiconazole은 3개 와인에서 6.5~30 ng mL⁻¹ (0.020~0.090 μM), flusilazole은 9개 와인에서 0.5~0.75 ng mL⁻¹ (1.585~2.378 nM), penconazole은 26개 와인에서 0.25~1.2 ng mL⁻¹ (2.134~10.244 nM), tebuconazole은 55개 와인에서 0.25~33 ng mL⁻¹ (0.812~107.206 nM), triadimenol은 33개 와인에서 0.5~2.2 ng mL⁻¹ (1.691~7.438 nM) 농도로 검출되었다. 특히 한 와인에서 2가지 이상의 azole이 검출되는 경우가 50% 이상으로 확인되었다(Trösken *et al.* 2005). 와인용 포도에 살포되는 또 다른 항곰팡이제인 vinclozolin 역시 수계에서 검출된다. Vinclozolin은 독일, 스페인 등의 하천수에서 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1.748 nM) 이상의 농도로 검출되었으며(Just *et al.* 1995; Gülden *et al.* 1997; Readman *et al.* 1997), 음용수에서도 0.35 nM 농도로 검출된 바 있다(Iwan 1988). 국내에서는 대전시 노은도매시장 채소류의 농약잔류량 검사한 결과 깻잎에서 triflumizole이 평균 0.28 mg kg⁻¹으로 잔류허용기준 이상으로 검출되었다(Han *et al.* 2003).

양서류 조직에서의 azole 검출사례로서 미국 캘리포니아주에서 Pacific chorus frog (*Pseudacris regilla*) 개체들로부터 pyrazole계에 속하는 pyraclostrobin과 triazole계에 속하는 tebuconazole 농도를 분석한 결과, 조사 지점에 따라 최소 7%에서 최대 63%의 개체들에서 pyraclostrobin

이 검출되었으며, 최소 30%에서 최대 60% 개체들에서 tebuconazole이 검출되었다. 또한, 개체 전체 조직으로부터 pyraclostrobin과 tebuconazole이 각각 최대 100, 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 이상의 농도로 검출되어 azole계 물질이 양서류에 농축될 수 있음이 확인되었다(Smalling *et al.* 2013).

Azole계열의 항곰팡이제 사용이 2000년대 이후로 급증함에 따라 이들 물질이 수생생물에 미치는 영향에 대한 객관적 분석이 요구되고 있다(Battaglin *et al.* 2011). 특히, 양서류 농경지를 주로 번식장소로 활용하고 배아 및 유생이 농경지에서 성장하는 양서류의 특성 상 하천에 서식하는 어류보다 고농도의 항곰팡이제에 더 많은 빈도로 노출될 가능성이 많다. 따라서 본 소고에서는 현재까지 수행된 azole계열의 imidazole, triazole, thiazole, oxazole, pyrazole 분류에 속하는 항곰팡이 물질이 양서류의 배아 및 유생, 생식기관 등에 미치는 영향에 대한 연구 결과를 조사하고 이를 기반으로 항곰팡이제가 양서류에 미치는 영향을 정리하였다.

본 론

1. Azole계열 항곰팡이제의 양서류에 대한 독성 연구 결과 문헌자료의 검색

Azole계열 항곰팡이제의 양서류에 대한 독성 연구결과 분석을 위해 NDSL (National Discovery for Science Leaders; www.ndsl.kr), NCBI (National Center for Biotechnology Information) Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)를 통해 자료를 수집하였다. 자료 수집에 사용된 키워드는 ‘Amphibia’, ‘Frog’, ‘Urodela’, ‘Anura’, ‘Azole’, ‘Antifungal’, ‘Antifungal agent’, ‘Fungicide’, ‘Imidazole’, ‘Bifonazole’, ‘Butoconazole’, ‘Climbazole’, ‘Clotrimazole’, ‘Croconazole’, ‘Econazole’, ‘Enilconazole’, ‘Fenticonazole’, ‘Flutrimazole’, ‘Isoconazole’, ‘Ketoconazole’, ‘Luliconazole’, ‘Miconazole’, ‘Neticonazole’, ‘Omoconazole’, ‘Oxiconazole’, ‘Sertaconazole’, ‘Sulconazole’, ‘Tioconazole’, ‘Triazole’, ‘Albaconazole’, ‘Fluconazole’, ‘Fosfluconazole’, ‘Triadimenol’, ‘Hexaconazole’, ‘Isavuconazole’, ‘Itraconazole’, ‘Miconazole’, ‘Myclobutanil’, ‘Paclobutrazol’, ‘Posaconazole’, ‘Pramiconazole’, ‘Propiconazole’, ‘Tebuconazole’, ‘Terconazole’, ‘Triamiphos’, ‘Triadimefon’, ‘Voriconazole’, ‘Thiazole’, ‘Abafungin’, ‘Thiabendazole’, ‘2-mercaptobenzothiazole’, ‘Ravuconazole’, ‘Pyrazole’, ‘Benzovindiflupyr’, ‘Bixafen’, ‘Fenpyrazamine’, ‘Fluxapyroxad’, ‘Furametypr’, ‘Isopyrazam’, ‘Penflufen’, ‘Penthiopyrad’,

‘Pyraclostrobin’, ‘Pyrametostrobin’, ‘Pyraoxystrobin’, ‘Rabenzazole’, ‘Sedaxane’, ‘Oxazole’, ‘Chlozoline’, ‘Dichlozoline’, ‘Drazoxolon’, ‘Famoxadone’, ‘Hymexazol’, ‘Metazoxolon’, ‘Myclozolin’, ‘Oxadixyl’, ‘Oxathiapiprolin’, ‘Pyrioxazole’, ‘Vinclozolin’, ‘Toxicity’, ‘Malformation’, ‘Survival’, ‘FETAX’, ‘Aromatase’ 등을 다양하게 조합하여 사용하였다. 이를 통해 항곰팡이제 및 azole계열 물질의 양서류에 대한 독성정보를 제공하는 19편의 논문이 검색되었다. 또한, azole과 관련한 생리학적인, azole계열 물질의 특징, 항곰팡이제의 작용기전 및 오염현황 등에 관한 44개의 문헌을 참고하였다. Azole계열 물질의 분류 및 International Organization for Standardization (ISO) 명칭은 ‘Alan Wood’s Web site’ (available in ‘http://www.alanwood.net/pesticides/’)을 참고하였다. Azole계열 물질이 양서류에 미치는 영향에 대해 보고한 문헌들은 1998~2013년 연구결과들로서 대상 물질의 종류는 imidazole 계열 (clotrimazole, econazole, fadrozole, ketoconazole, miconazole), triazole계열 (cyproconazole, fluconazole, itraconazole, tebuconazole, triadimefon) thiazole계열 (2-mercaptobenzothiazole, thiabendazole), oxazole계열 (vinclozolin), pyrazole계열 (pyraclostrobin) 등 총 14가지였다(Fig. 1). 실험대상 양서류의 종 수는 아프리카발톱개구리 (*Xenopus laevis*)를 포함하여 7종이었다.

2. Azole계열 항곰팡이제의 양서류에 대한 독성

1) Imidazole

Imidazole에 속하는 물질은 총 116종이며, 항곰팡이제로서 농업 및 의료 목적으로 사용되어지는 물질은 21가지이다(Hewitt 1998; Safrin 2009). 이 중 양서류를 이용한 독성평가가 수행된 물질은 clotrimazole, econazole, fadrozole, ketoconazole, miconazole 등이 있다.

(1) Clotrimazole

Clotrimazole은 아로마타제의 활성을 저해하는 물질로서 잘 알려져 있는 imidazole계열의 물질로서 무즙치료제로 널리 사용된다(Hewitt 1998). Clotrimazole을 변태 단계인 Nieuwkoop and Faber (NF; Nieuwkoop and Faber 1956) stage 56의 Western clawed frog (*X. tropicalis*)에 375 nM의 농도로 처리하였을 때, 뇌에서 아로마타제 활성을 저해하였으며, 변태를 마친 준성체에서 41 nM, 375 nM clotrimazole은 암수 모두에서 생식소/신장 복합체 (gonad/kidney complex)의 아로마타제 활성을 높이는 것으로 확인되었다(Gyllenhammar *et al.* 2009). 또한 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)에서 뇌하수체 균질 현탁액 (frog pituitary

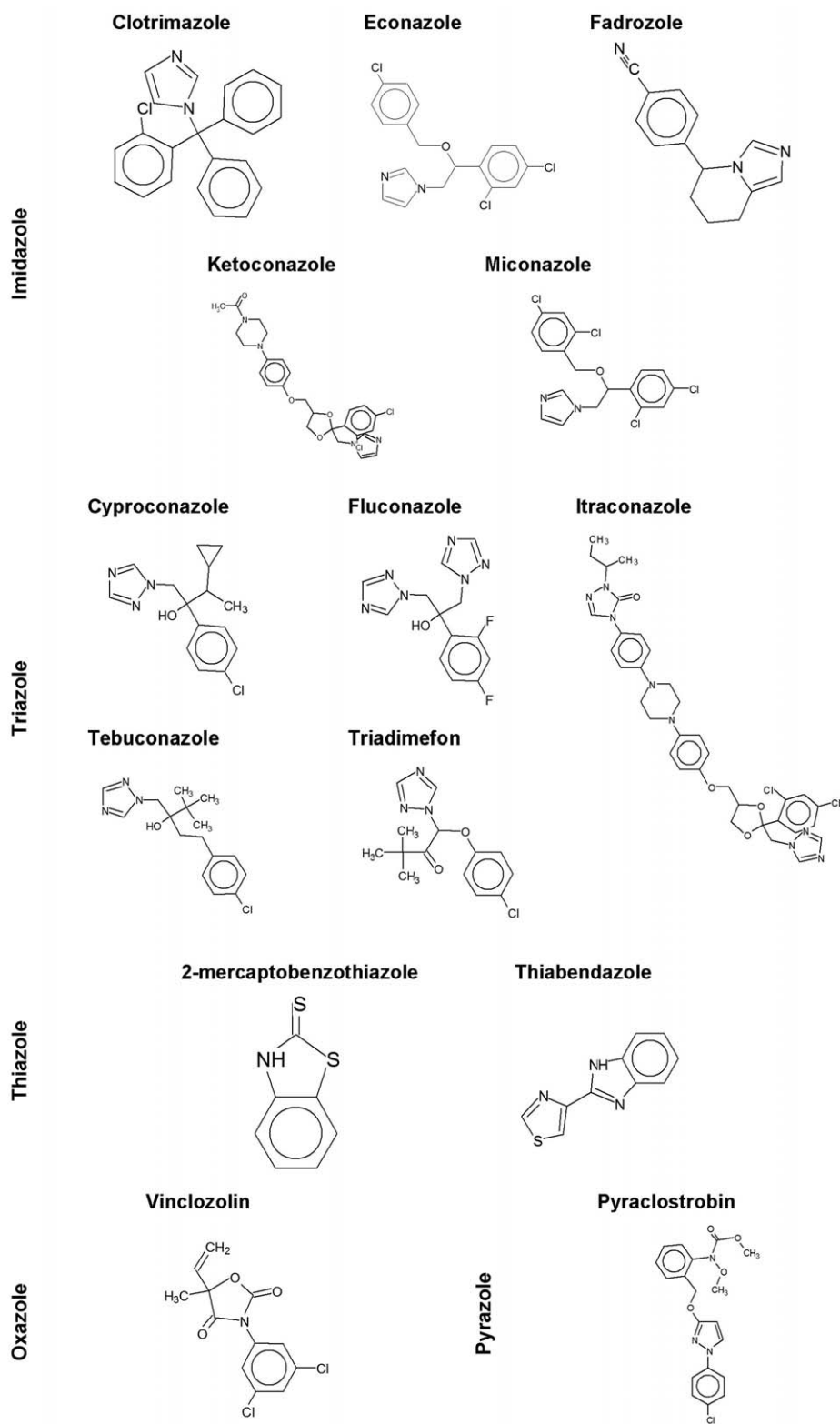


Fig. 1. Classification and molecular structure of azole fungicides. An azole is a class of five-membered nitrogen heterocyclic ring compounds containing at least one other non-carbon atom of either nitrogen, sulfur or oxygen. Imidazole and triazole have two and three nitrogen in azole ring, respectively. Thiazole has sulfur in azole ring. Oxazole has oxygen in azole ring. Pyrazole has two adjacent nitrogen in azole ring. OECD quantitative structure-activity relationship (QSAR) Toolbox Version 3.2 was used to assess chemical structure.

homogenate; FPH) 처리에 의한 난모세포(primary oocyte)의 성숙을 억제하였다. 또한 난모세포 성숙의 표지가 되는 난핵포붕괴(germinal vesicle breakdown; GVBD) 비율이 반으로 감소하는 농도인 EC₅₀(median effective concentration)은 6 µM로 확인되었다. Clotrimazole은 난모세포를 포함한 난소(ovary) 조직에서 FPH에 의해 유도된 난모세포의 배란 역시 강하게 억제하는 것으로 나타났으며, 이에 대한 EC₅₀은 44 µM으로 확인되었다(Choi *et al.* 2007). 콜레스테롤(cholesterol)을 프레그네놀론(pregnenolone; P₅)으로 변환시키는 cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P450sc)에 대한 clotrimazole의 영향을 분석한 연구에서 황소개구리(*R. catesbeiana*)의 난포에 FPH와 함께 clotrimazole을 18시간 동안 처리한 결과, 1 µM의 농도에서 cytochrome P450sc의 활성이 저해되었고, 이에 대한 median effective dose (ED₅₀)는 0.33 µM로 확인되었다. 매우 낮은 농도인 0.1 µM clotrimazole은 17α-hydroxy progesterone (17α-OHP)을 안드로스테네디온(androstenedione; AD)으로 변환시키는 17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase (cytochrome P450c17) 활성을 55% 억제하였으며, ED₅₀값은 0.25 µM로 확인되었다. 또한, clotrimazole은 아로마타제의 활성을 저해하였으며, ED₅₀의 값은 0.02 µM로 확인되었다(Kim *et al.* 2006).

(2) Econazole

*R. dybowskii*의 여포성 난모세포를 이용한 연구에서 난모세포의 성숙을 유도하기 위해 FPH를 처리한 후 econazole을 처리했을 때, 난모세포의 성숙이 억제되었고 GVBD 비율이 반으로 줄어드는 농도인 EC₅₀값은 46.6 µM로 확인되었다. 난소 조직에서 FPH에 의해 유도된 난모세포의 배란에 대한 econazole의 억제 효과는 비교적 약한 것으로 확인되었으며, 이에 대한 EC₅₀값은 72.2 µM이었다(Choi *et al.* 2007). *R. catesbeiana*의 난포에 econazole을 처리한 경우 cytochrome P450c17 활성 억제가 확인되었으며, 1 µM 농도의 econazole 처리 시 45%의 억제 효과를 보였다. 또한, econazole의 아로마타제 활성에 대한 ED₅₀은 0.07 µM로 확인되었다(Kim *et al.* 2006).

(3) Fadzole

유미양서류인 Spanish ribbed newt (*Pleurodele waltil*) 배아를 이용한 실험에서 0.4~1.0 mg L⁻¹ (1.792~4.479 µM) 농도의 fadzole을 생식소가 분화하기 직전 단계인 Gallien and Durocher (GD; Gallien and Durocher 1957) stage 52부터 변태단계인 GD stage 56까지 처리한 경우에 ZW 및 WW 성염색체를 갖는 암컷의 아로마타제 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, 특히 0.1~0.3 mg L⁻¹ (0.448~

1.344 µM)의 fadzole에 노출된 암컷의 생식소가 수컷화 및 중성화되었다(Chardard and Dournon 1999). 이와 유사하게 NF stage 15 *X. tropicalis* 배아에 처리된 fadzole 역시 수컷발생 비율을 유의적으로 증가시켰으며, 저농도인 1 µg L⁻¹ (4.479 nM)의 농도에서도 통계적으로 유의한 수컷비율의 증가를 유발하였다. 또한, 유생에 대한 4 µg L⁻¹ (0.018 µM)의 fadzole의 처리는 중성생식소 발달을 유도하는 것으로 확인되었으며, 부화 후 39주가 경과한 암컷 개체의 몸무게를 감소시키는 것으로 확인되었다(Olmstead *et al.* 2009).

(4) Ketoconazole

니조랄(Nizoral)로 잘 알려진 ketoconazole의 독성을 *R. dybowskii*의 여포성 난모세포를 이용해 분석한 연구에서 난모세포의 성숙을 유도하기 위해 FPH를 처리한 후 ketoconazole을 처리했을 때, 난모세포의 성숙이 억제되었고 GVBD 비율이 반으로 줄어드는 농도인 EC₅₀값은 4.5 µM로 확인되었다. 또한, 난소조직을 이용한 실험에서 ketoconazole이 FPH에 의해 유도된 배란을 억제하는 EC₅₀값은 4.4 µM로 확인되었다(Choi *et al.* 2007). *R. catesbeiana*의 난포를 이용한 연구에서 ketoconazole은 cytochrome P450sc의 활성을 억제하는 것으로 확인되었으며, ED₅₀은 0.91 µM로 나타났다. 또한, ketoconazole은 비교적 높은 농도인 100 µM에서 cytochrome P450c17의 활성을 억제하는 것으로 확인되었으며, 아로마타제에 대한 ketoconazole의 ED₅₀은 8 µM로서 비교적 낮은 농도에서 강한 억제효과를 보였다(Kim *et al.* 2006). 세포수준의 독성 연구로서 ketoconazole을 Egyptian toad (*Bufo regularis*)에 3개월 동안 0.2 mg day⁻¹ 농도로 경구투여 시 무과립백혈구(agranulocyte)의 핵 형태의 불규칙성, 핵막의 소수성공간 팽창, 틱니 모양의 핵막 등이 관찰되었다. 몇몇 림프구의 핵은 부분적으로 비어있고 응축성이 낮은 이질염색질이 관찰되었다. 또한, 단핵구는 보다 확연하게 변형되어 크기 및 형태가 불규칙한 핵과 비정상적인 염색질의 분포, 호염기성의 공포성 세포질이 나타났다. 몇몇 단핵구의 세포막은 사상위족(filopodia)형태로 확장되어, 세포 내 이입 소포(endocytic vesicle)를 형성하였다(El-Mofty *et al.* 2000).

(5) Miconazole

Miconazole은 비교적 높은 농도인 100 µM 수준에서 FPH에 의해 유도된 *R. dybowskii*의 여포성 난모세포 성숙을 억제하였고, GVBD에 대한 EC₅₀값은 63.6 µM로 확인되었다(Choi *et al.* 2007). Miconazole이 17α-OHP를 AD로 변화시키는 cytochrome P450c17에 미치는 영향을

Table 1. Toxicological effects of imidazoles on amphibian species

Azoles	Species	Stage or target	Concentration	Effects	References
Imidazole	<i>X. tropicalis</i>	NF stage 56	375 nM	Reduced activity of aromatase in brain	Gyllenhammar <i>et al.</i> 2009
	<i>X. tropicalis</i>	Froglet	41.375 µM	Increased activity of aromatase in gonad/kidney complex	
	<i>R. dybowskii</i>	Primary oocyte (24 h)	6 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced oocyte maturation	Choi <i>et al.</i> 2007
		Ovary (24 h)	44 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced ovulation	
	<i>R. catesbeiana</i>	Follicle (18 h)	0.33 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of cytochrome P450scc	Kim <i>et al.</i> 2006
		0.25 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of cytochrome P450c17		
		0.02 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of aromatase		
Econazole	<i>R. dybowskii</i>	Primary oocyte (24 h)	46.6 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced oocyte maturation	Choi <i>et al.</i> 2007
		Ovary (24 h)	72.2 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced ovulation	
Fadrozole	<i>R. catesbeiana</i>	Follicle (18 h)	0.07 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of aromatase	Kim <i>et al.</i> 2006
	<i>P. waltl</i>	GD stage 52 ~ 56	0.4 ~ 1.0 mg L ⁻¹ (1.80 ~ 4.48 µM)	Reduced activity of aromatase	Chardard and Dourmon 1999
	<i>X. tropicalis</i>	NF stage 15 ~ 66	0.1 ~ 0.3 mg L ⁻¹ (0.45 ~ 1.34 µM)	Masculinization of ovary	
		1 µg L ⁻¹ (4.48 nM)	Increased male ratio	Olmstead <i>et al.</i> 2009	
		4 µg L ⁻¹ (18.92 nM)	Intersex gonad in female		
Ketoconazole	<i>R. dybowskii</i>	Primary oocyte (24 h)	4.5 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced oocyte maturation	Choi <i>et al.</i> 2007
		Ovary (24 h)	4.4 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced ovulation	
	<i>R. catesbeiana</i>	Follicle (18 h)	0.91 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of cytochrome P450scc	Kim <i>et al.</i> 2006
			100 µM	Reduced activity of cytochrome P450c17	
		8 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of aromatase		
	<i>B. regularis</i>	Adult (3 month)	0.2 mg day ⁻¹	Increased abnormal lymphocytes and leukocyte	El-Mofty <i>et al.</i> 2000
Miconazole	<i>R. dybowskii</i>	Primary oocyte (24 h)	63.6 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced FPH-induced oocyte maturation	Choi <i>et al.</i> 2007
	<i>R. catesbeiana</i>	Follicle (18 h)	4.5 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of cytochrome P450c17	Kim <i>et al.</i> 2006
		0.8 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of aromatase		

NF stage, Nieuwkoop and Faber stage (1956); GD stage, Gallien and Durocher stage (1957); EC₅₀, median effective concentration; FPH, frog pituitary homogenate.

알아보기 위해 *R. catesbeiana*의 난포에 처리하였을 때 10 μM 농도에서 cytochrome P450c17에 대한 46%의 억제효과가 나타났으며 ED_{50} 은 4.5 μM 로 확인되었다. 또한, miconazole 처리용량에 비례하여 아로마타제 활성이 억제되었고, ED_{50} 은 0.8 μM 로 확인되었다(Kim *et al.* 2006). 유미양서류인 *P. waltl*의 배아를 이용한 실험에서 0.4~1.0 mg L^{-1} (0.961~2.403 μM)농도의 miconazole을 생식소가 분화하기 직전 단계인 GD stage 52부터 변태단계인 GD stage 56까지 처리한 경우에 ZW 및 WW 성염색체를 갖는 암컷의 아로마타제 활성을 억제하였다(Char-dard and Dournon 1999) (Table 1).

2) Triazole

Triazole에 속하는 물질은 총 59가지이며 항곰팡이제로 사용되는 물질은 16종이 있다(Hewitt 1998; Safrin 2009). 이 중 양서류를 이용한 독성평가가 진행된 물질로는 cyproconazole, fluconazole, itraconazole, tebuconazole, triadimefon 등이 있다.

(1) Cyproconazole

최근, 설치류와 양서류 배아를 이용해 일부 triazoles의 발생독성을 비교한 분석한 사례가 보고되었다. 백서(rat)와 *X. laevis*의 수정란을 체외배양하여 후기낭배기(NF stage 13) 도달 시 cyproconazole을 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 μM 농도로 처리한 실험에서 15.625 μM 이하의 cyproconazole 처리군에서는 백서와 *X. laevis* 수정란의 기형이 유발되지 않았다. 그러나 31.25 μM 이상의 cyproconazole 처리군에서 백서의 경우 아가미궁(branchial arches)의 기형발생과 더불어 전신적인 기형유발 현상이 관찰되었으며, *X. laevis* 배아 역시 동일 농도에서 안면연골의 유합이 발생하였으며, 125~250 μM 처리군에서는 입의 형태까지 변형되었다(Di Renzo *et al.* 2011b). 이러한 결과는 cyproconazole은 triadimefon과 비슷한 수준의 기형유발 능력을 갖지만 cyproconazole이 보다 전신적인 기형을 유발하는 것으로 사료된다.

(2) Fluconazole

양서류를 이용한 triazole계열 물질의 간독성 연구로서 *B. Regularis*를 대상으로 1회/1일, 20주 동안 0.26 mg의 fluconazole을 경구투여 한 결과 22%의 개체가 사망하였으며, 특히 간 및 지방조직에서 유의적인 병리학적 변화가 관찰되었다(Essawy *et al.* 2010). Triazole계열 물질이 세포수준에 미치는 영향으로서 인체의 20주 투약용 농도인 0.26 mg의 fluconazole을 *B. regularis*에 경구투여했을 때, 말초혈액의 혈구의 변형을 유발하였다. 또한, 호

중성백혈구는 불규칙한 핵 모양의 변화와 세포질의 구멍이 관찰되었으며, 림프구에서는 핵의 모양 변화, 핵공의 팽창, 공포가 있는 세포질과 불규칙한 형질막 등이 관찰되었다. 일부 림프구에서는 비정상적인 핵과 미토콘드리아가 나타났고, 단핵백혈구에서는 U, W 모양의 핵과 핵공의 팽창, 다양한 형태의 미토콘드리아, 세포질의 공포가 관찰되었다. 또한, 형질세포에서는 구조적 이상, 진정염색질의 우세와 핵막의 팽창을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 발암물질인 7,12 dimethylbenz anthracene에 노출된 사람의 백혈구에서 발견되는 변화와 비슷한 것이다(Essawy *et al.* 2005).

(3) Itraconazole

*R. dybowskii*의 여포성 난모세포에 itraconazole을 처리한 실험에서 FPH에 의해 유도된 난모세포의 성숙이 급격히 억제되었으며 GVBD에 대한 EC_{50} 값은 0.4 μM 이었다. 동일한 연구에서 난소 조직을 실험체로 하여 itraconazole이 FPH에 의해 유도된 배란에 미치는 영향을 확인하였을 때 EC_{50} 값은 0.8 μM 로서 itraconazole이 매우 강한 배란억제효과를 가지는 것이 확인되었다(Choi *et al.* 2007). *R. catesbeiana*의 난포를 이용한 연구에서 콜레스테롤이 p450scc에 의해 P_5 로 변환되는 과정을 itraconazole이 매우 강하게 억제하였으며 이에 대한 ED_{50} 은 0.04 μM 로 확인되었다(Kim *et al.* 2006).

(4) Tebuconazole

백서와 *X. laevis*의 수정란을 체외배양하여 tebuconazole을 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 μM 농도로 처리한 실험에서 31.25 μM 이하의 tebuconazole 처리군에서는 백서와 *X. laevis* 수정란의 기형이 유발되지 않았다. 그러나 62.5 μM 이상의 triadimefon 처리군에서 백서의 경우 첫 번째와 두 번째의 아가미궁의 유합이 유발되었으며, *X. laevis* 배아 역시 동일 농도에서 안면연골 방형골(quadrate)와 맥켈연골(Meckel cartilage)의 유합이 발생하는 기형이 유발되었다(Di Renzo *et al.* 2011b). 이러한 결과는 tebuconazole이 더 높은 농도 처리군에서 triadimefon과 유사한 형태의 기형을 유발함으로써 tebuconazole의 기형 유발능력이 triadimefon보다 낮음을 보여준다.

(5) Triadimefon

Triazole계열의 물질들 중 양서류에 대한 독성효과가 가장 많이 분석된 물질은 triadimefon인데 시판되고 있는 항곰팡이제인 'Bayleton'의 주원료로서 흰가루병(powdery mildews), 녹병(rusts)을 포함한 곰팡이 제어에 사용되고 있다(Kidd and James 1991). *X. laevis*의 배아를 이용

한 최기형성분석 시험(Frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*; FETAX)을 통해 triadimefon의 양서류 배아독성을 분석한 결과 1~62.5 μM 농도범위에서 처리 후 5일 경과 시 전 실험군에서 생존율에는 큰 변화가 없었지만 2.5 μM 이상에서 기형발생율이 증가하였으며(8.5%), 기형발생에 대한 EC_{50} 은 8.51 μM 로 확인되었다. Probit을 통해 추측된 LC_{50} 값을 이용해 계산한 최기형성지수(teratogenic index; TI) 값은 FETAX에서 제시하는 위험성(hazardous)기준인 1.5를 초과하였다. 특히 triadimefon은 *X. laevis* 배아 발생 중 두부 연골 기형을 동반한 안면기형을 주로 유발하는 것으로 확인되었으며, 신경배(neurula) 단계에 일시적으로(4시간) 처리한 경우 낭배기(gastrula)에 동일방법으로 처리한 경우보다 안면기형 유발효과가 더 큰 것으로 확인되었다(Groppelli *et al.* 2005). FETAX protocol을 이용한 또 다른 연구에서 triadimefon의 96 h LC_{50} 및 기형발생에 관한 EC_{50} 값은 각각 63.8 μM , 2.73 μM 로 나타났으며, 이에 대한 최기형성지수(teratogenic index; TI) 값은 23.4로 나타나 FETAX에서 제시하는 위험성 기준인 1.5를 초과하여 최기형성이 강한 것으로 확인되었다. 또한, 낭배와 신경배에 대한 2시간의 단기간 처리실험결과 신경배 처리 시 기형 유발율이 더 높은 것으로 나타났으며, 아가미 기형이 관찰되었고 부분적으로 입의 발달이상과 과다색소발현 등이 관찰되었다. 낭배 및 신경배 단계에 triadimefon에 노출된 경우 안면연골 형성이 저해되었다(Papis *et al.* 2006). 양서류와 설치류에서 이러한 기형은 신경능선세포(neural crest cell; NCC)가 아가미 간층조직(branchial mesenchyme)으로 비정상적으로 이동하기 때문인 것으로 알려져 있다(Groppelli *et al.* 2005; Menegola *et al.* 2005). 이러한 NCC의 이동은 배아의 앞쪽 부분의 발생에 근간이 되는 사건으로서 HOX 유전자 및 앞뒤축 형성에 관여하는 retinoic acid(RA)의 구배에 의해 조절된다(Hunt *et al.* 1991; Durston *et al.* 1997; Rijli *et al.* 1998; Pasqualetti *et al.* 2000; Baltzinger *et al.* 2005). 또한, CYP26 단백질은 RA의 대사에 관여하는 주된 효소(key enzyme)으로 알려져 있다(White *et al.* 1996). 이러한 기작을 통해 triadimefon의 발생독성을 분석한 결과로서, *X. laevis* 배아에 500 μM 의 triadimefon 처리 시 cellular retinoic acid binding proteins (CRABP)와 homeobox A2 (HOXA2) 유전자의 발현위치 변화를 확인할 수 있었다. 또한, 전장(anterior gut)과 연골을 형성하는 신경관 전구체(neural crest precursor)에서 발현되는 bagpipe (BAP) 유전자 역시 비정상적인 위치에서 발현되는 것이 확인되었다(Papis *et al.* 2007). 이와 유사한 연구결과로서, 초기 신경배단계의 *X. laevis* 배아에 triadimefon을 500 μM 의

농도로 노출시켰을 때 부화한 개체에서 안면의 심각한 결함 및 굵은 전뇌, 비정상적인 후뇌분절을 확인할 수 있었다. 또한, 신경관이 닫힌 이후 단계의 배아(NF stage 27)에서 CYP26 유전자가 비정상적으로 증가하였다(Di Renzo *et al.* 2011a). 앞서 언급된 사례들보다 비교적 낮은 농도의 triadimefon의 독성을 분석한 사례로서 21.88 mg L^{-1} (74.483 μM)농도의 triadimefon을 *X. laevis*의 유생에 노출시켰을 때, 장의 기형과 부종(edema)의 형성이 발견되었다. 또한, 제초제인 atrazine과 triadimefon을 함께 노출시켰을 때 골격근 퇴화가 확인되었다(Lenkowski *et al.* 2010). 백서와 *X. laevis*의 수정란을 체외배양하여 triadimefon을 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 μM 농도로 처리한 실험에서 15.625 μM 처리군에서는 백서와 *X. laevis* 수정란의 기형이 유발되지 않았다. 그러나 31.25 μM 이상의 triadimefon 처리군에서 백서의 경우 첫 번째와 두 번째의 아가미공의 유합이 유발되었으며, *X. laevis* 배아 역시 동일 농도에서 안면기형 및 연골 기형 발생이 유발되었다(Di Renzo *et al.* 2011b). 이로서 triadimefon의 안면기형 및 연골 기형발생 효과는 양서류에 국한된 것이 아닌 것으로 확인되었다(Table 2).

3) Thiazole

Thiazole에 속하는 물질은 총 88가지이며, 항곰팡이제로써 농업 및 의료목적에 사용되는 물질은 총 4가지이다(Hewitt 1998; Safrin 2009). 이 중 양서류를 이용한 독성평가가 진행된 물질로는 thiabendazole, 2-mercaptobenzothiazole 등이 있다.

(1) 2-mercaptobenzothiazole

각기 다른 농도의 2-mercaptobenzothiazole이 함유된 배양액에 NF stage 54의 *X. laevis* 유생을 7일간 배양하였을 때 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.108 μM) 이상의 농도에서는 갑상선에서 triiodothyronine (T3)와 thyroxine (T4)가 감소하였다. 또한 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.221 μM) 이상의 농도에서는 여포세포(follicular cell)의 비대(hypertrophy) 및 과다증식(hyperplasia)과 갑상선으로 요오드(iodide)를 수송하는 역할을 하는 소듐/요오드 동반수송체(sodium/iodide symporter) 발현이 증가하였다. 82 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.490 μM) 이상에서는 갑상선에서 갑상선호르몬 전구체인 3,5-diiodo-L-tyrosine 농도는 감소하고, 갑상선 내 요오드와 혈청 내 갑상선자극호르몬(thyroid stimulating hormone) 수치는 증가하였다. 174 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1.040 μM) 이상의 농도에서는 갑상선 내에서 갑상선호르몬 전구체인 3-monoiodo-L-tyrosine와 혈청 내 T4 농도가 감소하였다(Tietge *et al.* 2013). 이상의 결과들은 2-mercaptobenzothiazole이 양서류의 갑상선의 기능

Table 2. Toxicological effects of triazoles on amphibian species

Azoles	Species	Stage or target	Concentration	Effects	References	
Triazole	Cyproconazole	<i>X. laevis</i>	NF stage 13 ~47	31.25 µM	Increased craniofacial malformation Fused facial cartilages	Di Renzo <i>et al.</i> 2011b
	Fluconazole	<i>B. regularis</i>	Adult	125 ~ 250 µM	Abnormal morphology in mouth	
			Adult	0.26 mg day ⁻¹ (20 weeks)	22% of lethal rate	Essawy <i>et al.</i> 2010
			Adult	0.26 mg day ⁻¹ (20 weeks)	Increased abnormal lymphocytes and leukocyte	Essawy <i>et al.</i> 2005
	Itraconazole	<i>R. dybowskii</i>	Primary oocyte (24 h)	0.4 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced oocyte maturation	Choi <i>et al.</i> 2007
			Ovary (24 h)	0.8 µM (EC ₅₀)	Inhibited FPH-induced ovulation	
		<i>R. catesbeiana</i>	Follicle (18 h)	0.04 µM (EC ₅₀)	Reduced activity of cytochrome P450scc	Kim <i>et al.</i> 2006
	Tebuconazole	<i>X. laevis</i>	NF stage 13 ~47	62.5 µM	Increased craniofacial malformation Fused quadrate and Meckel cartilage	Di Renzo <i>et al.</i> 2011b
	Triadimefon	<i>X. laevis</i>	NF stage 8 ~47	8.51 µM (EC ₅₀)	Increased abnormality in head cartilages	Groppelli <i>et al.</i> 2005
		<i>X. laevis</i>	NF stage 9 ~47	63.8 µM (LC ₅₀), 2.73 µM (EC ₅₀)	Increased abnormalities in gill and mouth Hyperpigmentation	Papis <i>et al.</i> 2006
		<i>X. laevis</i>	NF stage 10 ~47	500 µM	Abnormal localization of CRABP, HOXA2, BAP mRNA	Papis <i>et al.</i> 2007
		<i>X. laevis</i>	NF stage 13 ~47	500 µM	Increased craniofacial malformation, bent forebrain and abnormal hindbrain segmentation	Di Renzo <i>et al.</i> 2011a
			NF stage 13 ~17 or 27	500 µM	Increased CYP26 mRNA	
		<i>X. laevis</i>	NF stage 41 (48 h)	21.88 mg L ⁻¹ (74.48 µM)	Increased abnormal intestine and edema	Lenkowski <i>et al.</i> 2010
		<i>X. laevis</i>	NF stage 13 ~47	31.25 µM	Increased craniofacial malformation Fused facial cartilages	Di Renzo <i>et al.</i> 2011b

NF stage, Nieuwkoop and Faber stage (1956); EC₅₀, median effective concentration; LC₅₀, median lethal concentration; FPH, frog pituitary homogenate; CRABP, cellular retinoic acid-binding proteins; HOXA2, homeobox A2; BAP, backpipe.

이상을 야기하므로 양서류 유생의 성장 및 변태 (metamorphosis) 이상을 유발할 가능성이 있음을 시사한다.

(2) Thiabendazole

Thiabendazole이 양서류에 미치는 영향은 비교적 최근에 보고되었다. 발생중인 *X. laevis* 배아의 NF stage 31에 250 μM 농도로 thiabendazole을 처리하고 35 stage에서 관찰한 결과, 후 기본 정맥 (posterior cardinal vein), 원체 절간 정맥 (intersomitic vein) 등의 혈관형성이 억제되었다 (Cha *et al.* 2012). 또한 NF 47 stage의 *X. laevis*의 유생에 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (3.478 nM)의 thiabendazole을 처리하였을 경우, 대조군에 비해 heat shock protein 70 kDa (HSP70)과 interleukin-1 beta (IL-1 β)의 mRNA가 두 배 가까이 증가하였다 (Martini *et al.* 2010). 이를 통하여 thiabendazole은 강력한 면역자극물질 (immunostimulating compound)임을 알 수 있다 (Table 3).

4) Oxazole

Oxazole에 속하는 물질은 총 23가지이며, 항곰팡이제로써 농업 및 의료목적에 사용되는 물질은 총 14가지이다 (Hewitt 1998; Safrin 2009). 이 중 양서류를 이용한 독성평가가 진행된 물질로는 vinclozolin이 있다. Retinol-binding protein (RBP)은 간에서 합성되어 혈액으로 분비되며, 소수성 (hydrophobic)인 retinol (vitamin A)과 결합하여 세포 내로 운반해주는 역할을 한다. 이러한 RBP유전자의 발현은 스테로이드호르몬에 의해 조절되며, 남성호르몬 (androgen)이나 항여성호르몬 (anti-estrogen)에 의해 발현이 감소한다 (McKearin *et al.* 1987; McKearin and Shapiro 1988). 이러한 기작을 이용해 vinclozolin이 갖는 남성호르몬-수용체 결합에 대한 길항작용을 분석한 사례가 있다. 남성호르몬인 androstanolone과 다양한 농도의 vinclozolin을 *X. laevis* hepatocyte에 36시간 처리한 결과, androstanolone에 의한 RBP 유전자 발현감소가 vinclozolin 농도 의존적으로 회복되는 경향을 보였다. 특히, 1 μM 의 vinclozolin 처리 시 androstanolone에 의한 RBP 유전자 발현감소가 완전히 극복되었다 (Levy *et al.* 2004). 따라서 vinclozolin은 항남성호르몬으로서 작용할 수 있음을 확인하였다. *X. laevis*에 100 $\mu\text{g g}^{-1} \text{ week}^{-1}$ 의 농도로 vinclozolin을 28일 동안 복강주사한 경우 양서류 수컷에서 2차 성징을 통해 발달하는 포접돌기 (nuptial gland) 상피 두께가 대조군에 비하여 절반 가까이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 포접돌기의 단면적이 대조군에 비하여 크게 감소하였다 (van *et al.* 2003). *X. laevis* 수컷 개체를 이용한 연구에서 human chorionic gonadotropin (hCG)를 처리하여 번식행동을 유도한 경우 vinclozolin 처리

Table 3. Toxicological effects of thiazoles on amphibian species

Azoles	Species	Stage or target	Concentration	Effects	References
Thiazole	<i>X. laevis</i>	NF 54 stage (7 days)	18 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.11 μM)	Decreased T3 and T4 in thyroid	Tietge <i>et al.</i> 2013
			37 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.22 μM)	Hypertrophy and hyperplasia in follicular cell Decreased expression of sodium/iodide symporter gene in thyroid	
Thiabendazole	<i>X. laevis</i>		82 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.49 μM)	Decreased 3,5-diiodo-L-tyrosine level in thyroid Increased iodide in thyroid Increased TSH level in serum	Cha <i>et al.</i> 2012
			174 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1.04 μM)	Decreased 3-monoiodo-L-tyrosine level in thyroid Increased TSH level in serum	
		NF stage 31-35	250 μM	Inhibited formation of posterior cardinal vein and intersomitic vein	
	<i>X. laevis</i>	NF stage 47	0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (3.48 nM)	Increased HSP70 and IL-1 β mRNA	Martini <i>et al.</i> 2010

NF stage, Nieuwkoop and Faber stage (1956); T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; HSP70, heat shock 70kDa protein; IL-1 β , Interleukin-1 beta.

시 1 μM 처리군에서 번식을 위한 울음소리가 감소하였다. 또한, 동일 농도에서 울음소리의 특징도 변형되었다 (Hoffmann and Kloas 2010). 이러한 결과는 vinclozolin이 양서류 수컷의 번식행동에도 영향을 미쳐 개체군 수준의 생식성공에 변화를 초래할 수 있을 것이므로 항공광이제에 의한 양서류 개체군의 손상 가능성이 제시되었다 (Table 4).

5) Pyrazole

Pyrazole에 속하는 물질은 총 47가지이며, 항공광이제 로써 농업 및 의료목적에 사용되는 물질은 총 11가지이다 (Hewitt 1998; Safrin 2009). 이 중 양서류를 이용한 독성평가가 진행된 물질로는 pyraclostrobin이 있다. Gosner (GS) stage 25 Great Plains toad (*Bufo cognatus*) 유생에 pyraclostrobin 및 이를 주성분으로 한 Headline[®]을 0.5, 1.7, 5, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.001, 0.004, 0.013, 0.039 μM)의 농도로 처리한 후 4일간 배양 시, pyraclostrobin은 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.013 μM) 농도 이하에서는 유생의 생존에 영향을 미치지 않았다. 그러나 Headline[®]은 동일 농도에서 약 80%의 유생 사멸율을 보였으며, 두 물질 모두 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.039 μM) 농도로 처리 시 모든 유생이 사멸하였다. 이러한 결과로부터 산출된 72시간 LC_{50} 값은 pyraclostrobin, Headline[®] 각각 10, 3.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.026, 0.010 μM)로 확인되었다. 또한 탱크에 처리된 두 물질의 농도는 4일간 점차 낮아졌지만 시험 종료 시 농도를 측정 한 결과 Headline[®]의 농도가 pyraclostrobin에 비해 높은 것을 확인하였다 (Hooser *et al.* 2012). 이러한 결과는 pyraclostrobin과 같은 azole 물질 자체가 독성을 갖을 뿐만 아니라 이를 원료로 사용하여 제조하고 시판되는 제품들의 독성이 더 강할 수 있음을 의미한다 (Table 4).

3. Azole계열 항공광이제의 양서류 독성의 요약

Azole계열에 속하는 항공광이제로 사용되는 imidazole 계열의 물질들의 공통적인 독성 메커니즘은 다양한 동물에서 아로마타제 (CYP19) 효소의 활성을 억제하는 것으로 알려졌으며, 양서류에서 독성이 분석된 물질들 중 fadrozole을 제외한 4종의 imidazole 물질이 양서류의 난자 성숙 및 배란을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, fadrozole 및 miconazole은 양서류에서 성 역전현상을 유발하는 것이 확인되었다. 이는 주로 암컷의 수컷화 현상으로 나타났으며, 이는 azole계 물질의 아로마타제 활성 억제 효과와 관련된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 imidazole계열의 물질이 양서류의 발생, 성 분화, 생식기능에 위해성을 나타냄을 보여준다. Ketoconazole은 백혈

Table 4. Toxicological effects of oxazole and pyrazole on amphibian species

Oxazole	Azoles	Species	Stage or target	Concentration	Effects	References
Vinclozolin		<i>X. laevis</i>	Adult (male)	100 $\mu\text{g g}^{-1} \text{ week}^{-1}$	Decreased nupital gland epithelium height Decreased cross-sectional areas of nupital gland	van <i>et al.</i> 2013
			Hepatocyte	1 μM (36 h)	Attenuated androstanolone-induced RBP gene suppression	Levy <i>et al.</i> 2004
			Adult (male)	1 μM (4 days)	Reduced mating call	Hoffmann and Kloas 2010
Pyrazole	Pyraclostrobin	<i>B. cognatus</i>	GS stage 25 (6 days)	0.026 μM (LC_{50})	Increased mortality	Hooser <i>et al.</i> 2012
	Headline [®] (pyraclostrobin formulation)	<i>B. cognatus</i>	GS stage 25 (6 days)	0.01 μM (LC_{50})	Increased mortality	Hooser <i>et al.</i> 2012

GS stage, Gosner stage (1960); RBP, retinol binding protein.

구의 물리화학적 특성을 교란하여 양서류의 면역계에 영향을 미칠 수 있는 것이 확인되었다. Triazole계열의 물질들은 주로 양서류 배아의 초기발생과정에 직접적으로 안면 연골을 포함한 두부 기형을 유발하는 것으로 확인되었다. *X. laevis* 배아를 이용한 시험에서 cyproconazole, tebuconazole, triadimefon이 양서류 배아에 대해 최기형성 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, itraconazole은 양서류 난자의 성숙 및 배란을 억제하는 것으로 확인되었다. 최근의 electrospray ionization mass spectrometry를 사용해 분석한 연구결과 triazole에 속하는 tebuconazole은 카드뮴(cadmium)과 같은 중금속과 결합하는 것으로 보고되었다(Norková *et al.* 2012). 이는 azole계 물질들이 수계 내 중금속과 상호작용 및 결합하여 예측하지 못한 독성효과를 나타낼 수 있음을 의미한다. Fluconazole은 양서류에서 간독성을 가지는 것으로 확인되었으며, 말초혈액의 혈구 및 백혈구의 형태적 손상을 야기하는 것으로 나타났다. Thiazole계열의 물질들 중 thiabendazole은 양서류의 혈관형성 및 면역반응의 변화를 유발하며, 2-mercaptobenzothiazole은 갑상선계를 교란하는 것으로 확인되었다. 이는 양서류의 초기발생 뿐만 아니라 갑상선 호르몬에 의해 유도되는 변태과정이 azole계 물질에 의해 교란될 수 있음을 의미한다. Oxazole에 속하는 vinclozolin은 항남성호르몬으로서의 기능이 양서류에서도 검증되었으며, 양서류의 번식행동에 영향을 미쳐 개체군의 안전을 위협할 수 있는 것으로 확인되었다. Pyrazole계열의 물질에 대한 양서류 독성평가는 전반적으로 부족한 상황이며, pyraclostrobin의 경우 양서류 유생에 대한 사멸유도 효과만이 확인되었다.

결론 및 제언

본 소고를 통해 파악된 azole계열 항곰팡이제는 농약이 사용되는 농경지 및 생활하수에 의약품이 혼재하는 도심하천에서 양서류 개체 및 개체군의 손상을 야기할 가능성이 있는 것으로 사료된다. 나아가 먹이사슬 및 생태계의 교란을 야기할 수 있을 것으로 생각된다. 향후, 국내에서도 과수원을 포함한 농경지 및 주변 수계를 비롯한 도심하천에서 생활하수에 대한 정밀한 모니터링을 통해 양서류를 비롯한 척추동물의 발생, 분화, 생식에 영향을 미칠 수 있는 azole계열 물질에 대한 감시가 필요할 것이다. 또한, 현재까지 양서류 독성이 분석되지 않은 많은 azole계 항곰팡이물질들에 대한 독성분석이 이뤄져야 할 것이며, tebuconazole이 중금속과 결합하는 사례

와 같이 기존에 사용되고 있는 azole계열 물질들과 중금속의 상호작용 및 그에 따른 독성효과 또한 분석되어야 할 것이다. 한편 azole계열 항곰팡이제의 양서류의 독성효과와 관련된 자료의 대부분은 실험모델 양서류인 *Xenopus*를 대상으로 생성된 것으로서 한국산 토종 양서류에 미치는 독성효과에 대한 종합적인 검토가 필요한 것으로 사료된다.

적 요

양서류는 육상과 수상생태계를 연결하는 먹이사슬의 연결자로 진화적 생태적 지위를 갖는다. 양서류의 배아와 유생은 모체와 독립되어 수환경 내에서 초기발생 및 성장하기 때문에 수환경에 존재하는 다양한 화학물질에 직접적으로 노출될 수 있다. Azole계열 항곰팡이제는 농업 및 의료용으로 널리 사용되는 화학물질로서 농지, 하수처리장 등으로 부터 수계로 유입된다. 최근, 양서류에서 이러한 azole계 물질에 의한 기형유발, 내분비계장애 효과가 증가하고 있다. 본 소고에서는 azole계 물질의 양서류 독성을 파악하고 azole계 물질의 안전한 이용을 위한 가이드라인을 제공하고자 azole계열에 속하는 imidazole, triazole, thiazole, oxazole, pyrazole 항곰팡이 물질이 양서류의 발생, 분화, 생식 등에 미치는 영향에 대해 최근까지의 연구결과를 정리하였다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대에코이노베이션 환경기술개발사업(2013년) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- Ankley GT, KM Jensen, EJ Durhan, EA Makynen, BC Butterworth, MD Kahl, DL Villeneuve, A Linnum, LE Gray, M Cardon and VS Wilson. 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fatheadminnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 86:300-308.
- Baltzinger M, M Ori, M Pasqualetti, I Nardi and FM Rijli. 2005. Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Dev. Dyn.* 234:858-867.
- Battaglin W, M Sandstrom, K Kuivila, D Kolpin and M Meyer.

2011. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water Air Soil Pollut.* 218:307-322.
- Bögi C, J Schwaiger, H Ferling, U Mallow, C Steineck, F Sinowatz, W Kalbfus, RD Negele, I Lutz and W Kloas. 2003. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environ. Res.* 93:195-201.
- Boyer R and CE Grue. 1995. The need for water quality criteria for frogs. *J. Environ. Health Perspect.* 103:352-357.
- Cha HJ, M Byrom, PE Mead, AD Ellington, JB Wallingford and EM Marcotte. 2012. Evolutionarily repurposed networks reveal the well-known antifungal drug thiabendazole to be a novel vascular disrupting agent. *PLoS Biol.* 10:e1001379.
- Chardard D and C Dournon. 1999. Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the Newt *pleurodeles waltl*. *J. Exp. Zool.* 283:43-50.
- Choi MJ, SC Kim, AN Kim, HB Kwon and RS Ahn. 2007. Effect of endocrine disruptors on the oocyte maturation and ovulation in amphibians, *Rana dybowskii*. *Integ. Biosci.* 11:1-8.
- Di Renzo F, R Bacchetta, A Bizzo, E Giavini and E Menegola. 2011b. Is the amphibian *X. laevis* WEC a good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of the three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. *Reprod. Toxicol.* 32:220-226.
- Di Renzo F, R Bacchetta, L Sangiorgio, A Bizzo and E Menegola. 2011a. The agrochemical fungicide triadimefon induces abnormalities in *Xenopus laevis* embryos. *Reprod. Toxicol.* 31:486-493.
- Durston AJ, J van der Wees, WW Pijnappel, JG Schilthuis and SF Godsavage. 1997. Retinoid signalling and axial patterning during early vertebrate embryogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:339-349.
- El-Mofty MM, AE Essawy, MH Shwairid and HM Abdel-Karim. 2000. The use of swiss albino mice and egyptian toads (*Bufo regularis*) as reliable biological test animals for screening chemicals and drugs which induce leukaemia in man. I: The effect of Nizoral (ketoconazole) on leucocytes of toads and mice. *Pakistan J. Biol. Sci.* 3:411-414.
- Essawy AE, AH El-Zoheiry, MM El-Mofty, SF Helal and EM El-Bardan. 2005. Pathological changes of the blood cells in fluconazole treated toads. *Science Asia* 31:43-47.
- Essawy AE, SF Helal, AH El-Zoheiry and EM El-Bardan. 2010. Hepatotoxicity induced by antifungal drug fluconazole in the Toads (*Bufo Regularis*). *J. Drug Metabol. Toxicol.* 1: 106-109.
- Gallien L and M Durocher. 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 91:97-114.
- Ghannoum MA and LB Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:501-517.
- Gianessi L and N Reigner. 2006. Pesticide use in US crop production 2002-With comparison to 1992 & 1997. Washington, D.C., CropLife Foundation. Available at <http://www.croplifefoundation.org>.
- Gosner K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
- Groppelli S, R Pennati, F De Bernardi, E Menegola, E Giavini and C Sotgia. 2005. Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: craniofacial defects. *Aquat. Toxicol.* 73:370-381.
- Gülden M, A Turan and H Seibert. 1997. Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. UBA-Texte 1997, 46/97, Berlin. Umweltbundesamt.
- Gyllenhammar I, E Hanna, S Anneli, HL Richard, F Jerker and B Cecilia. 2009. Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *xenopus tropicalis* frogs. *Aquat. Toxicol.* 91:102-109.
- Han KT, KS Lee, EK Lee, YJ Lee, KY Ko, DJ Won, JW Lee and SD Kwon. 2003. Pesticide residue survey and estimate intake amount of vegetables in Noeun wholesale market, Daejeon. *Korean J. Environ. Agri.* 22:210-214.
- Hewitt HG. 1998. Fungicides in Crop Protection. CAB International. New York. pp. 60-86.
- Hoffmann F and W Kloas. 2010. An environmentally relevant endocrine-disrupting antiandrogen, vinclozolin, affects calling behavior of male *Xenopus laevis*. *Horm. Behav.* 58:653-659.
- Hooser EA, JB Belden, LM Smith and ST McMurry. 2012. Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. *Ecotoxicology* 21: 1458-1464.
- Hunt P, M Gulisano, M Cook, MH Sham, A Faiella, D Wilkinson, E Boncinelli and R Krumlauf. 1991. A distinct Hox code for the branchial region of vertebrate head. *Nature* 353: 861-864.
- Iwan J. 1988. Pflanzenschutzmittel in grund- und trinkwasser-ergebnisse einer untersuchung in der bundesrepublik deutschland. *Gesunde Pflanzen* 40:208-213.
- Just P, U Greulach, G Henze and D Rinne. 1995. Trace analysis of vinclozolin by gas chromatography with electrolytic conductivity detection and solid-phase extraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* 352:385-387.
- Kahle M, IJ Buerge, A Hauser, MD Müller and T Poiger. 2008.

- Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 42:7193-7200.
- Kelce WR and EM Wilson. 1997. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J. Mol. Med. JMM* 75:198-207.
- Kidd H and DR James. (eds) 1991. *The Agrochemicals Handbook*. Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK (As Updated).
- Kim AN, RS Ahn and HB Kwon. 2006. Effects of Azoles on the in vitro follicular steroidogenesis in amphibians. *Integ. Biosci.* 10:203-209.
- Kloas W and I Lutz. 2006. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *J. Chromatogr. A* 1130:16-27.
- Lahr J. 1997. Ecotoxicology of organisms adapted to life in temporary freshwater ponds in arid and semi-arid regions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32:50-57.
- Lenkowski JR, G Sanchez-Bravo and KA McLaughlin. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *J. Environ. Sci.* 22:1305-1308.
- Levy G, I Lutz, A Krüger, W von Tümpling and W Kloas. 2004. Retinol-binding protein as a biomarker to assess endocrine-disrupting compounds in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:676-683.
- Loeffler IK, DL Stocum, JF Fallon and CU Meteyer. 2001. Leaping lopsided: a review of the current hypotheses regarding etiologies of limb malformations in frogs. *Anat. Rec.* 265:228-245.
- Martini F, C Fernández, LS Segundo, JV Tarazona and MV Pablos. 2010. Assessment of potential immunotoxic effects caused by cypermethrin, fluoxetine, and thiabendazole using heat shock protein 70 and interleukin-1 β mRNA expression in the anuran *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol. Chem.* 29: 2536-2543.
- McKearin DM and DJ Shapiro. 1988. Persistent estrogen induction of hepatic *Xenopus laevis* serum retinol binding protein mRNA. *J. Biol. Chem.* 263:3261-3265.
- McKearin DM, MC Barton, MJ Keller and DJ Shapiro. 1987. Estrogen induces transcription of the *Xenopus laevis* serum retinol-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* 262:4939-4942.
- Menegola E, ML Broccia, Di Renzo F, V Massa and E Giavini. 2005. Study on the common teratogenic pathway elicited by the fungicides triazole-derivatives. *Toxicol. In Vitro* 19: 737-748.
- Nieuwkoop PD and J Faber. 1956. *Normal Table of Xenopus laevis*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Norková R, JJ Dytřtová, M Jakl and D Schröder. 2012. Formation of tebuconazole complexes with cadmium (II) investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Water Air Soil Pollut.* 223:2633-2640.
- Olmstead AW, PA Kosian, JJ Krte and GW Holcombe. 2009. Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor. *Aquat. Toxicol.* 91:143-150.
- Papis E, G Bernardini, R Gornati and M Prati. 2006. Triadimefon causes branchial arch malformations in *Xenopus laevis* embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13:251-255.
- Papis E, G Bernardini, R Gornati, E Menegola and M Prati. 2007. Gene expression in *Xenopus laevis* embryos after Triadimefon exposure. *Gene Expr. Patterns* 7:137-142.
- Pasqualetti M, M Ori, I Nardi and FM Rijli. 2000. Ectopic Hoxa2 induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development* 127:5367-5378.
- Readman JW, TA Albanis, D Barcel, S Galassi, J Tronczynski and GP Gabrielides. 1997. Fungicide contamination of Mediterranean estuarine waters: results from a MED POL pilot survey. *Mar. Pollut. Bull.* 34:259-263.
- Rijli FM, A Gavalas and P Chambon. 1998. Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes. *Int. J. Dev. Biol.* 42:393-401.
- Roberts PH and KV Thomas. 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 356:143-153.
- Safrin S. 2009. Antiviral agents. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. *Basic and clinical pharmacology*. 11th ed. New York: McGraw-Hill. pp. 845-875.
- Sheehan DJ, CA Hitchcock and CM Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 40-79.
- Smalling KL, GM Fellers, PM Kleeman and KM Kuivila. 2013. Accumulation of pesticides in Pacific chorus frogs (*Pseudacris regilla*) from California's Sierra Nevada Mountains, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 32:2026-2034.
- Thomas KV and MJ Hilton. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49:436-444.
- Tietge JE, SJ Degitz, JT Haselman, BC Butterworth, JJ Korte, PA Kosian, AJ Lindberg-Livingston, EM Burgess, PE Blackshear and MW Hornung. 2013. Inhibition of the thyroid hormone pathway in *Xenopus laevis* by 2-mercaptobenzothiazole. *Aquat. Toxicol.* 126:128-136.
- Trösken ER, K Scholz, RW Lutz, W Volkel, JA Zarn and WK Lutz. 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr. Res.* 30:387-

- 394.
- Trösken ER, N Bittner and W Völkel. 2005. Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1083:113-119.
- van Wyk JH, EJ Pool and AJ Leslie. 2003. The effects of anti-androgenic and estrogenic disrupting contaminants on breeding gland (nuptial pad) morphology, plasma testosterone levels, and plasma vitellogenin levels in male *Xenopus laevis* (African clawed frog). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 247-256.
- White JA, YD Guo, K Baetz, B Beckett-Jones, J Bonasoro, KE Hsu, FJ Dilworth, G Jones and M Petkovich. 1996. Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271:29922-29927.
- Zarn JA, BJ Brüsweiler and JR Schlatter. 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111:255-261.

Received: 18 February 2014

Revised: 10 March 2014

Revision accepted: 11 March 2014